

*На правах рукописи*

**ЧАРЛИНА**  
**Наталья Александровна**

**СТРОЕНИЕ, РАЗВИТИЕ И РЕГЕНЕРАЦИЯ КОМПЛЕКСА СТРУКТУР,  
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ АУТОТОМИЮ ДИСКА У ОФИУР**

03.00.30 – биология развития, эмбриология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

**Владивосток – 2008**

**Работа выполнена в Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского  
Дальневосточного отделения Российской Академии наук**

**Научный руководитель:**

*Доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Долматов Игорь Юрьевич*

**Официальные оппоненты:**

*Доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Вараксин Анатолий Алексеевич*

*Кандидат биологических наук,  
доцент  
Токмакова Наталья Павловна*

**Ведущая организация:**

Институт цитологии РАН

Защита состоится “5” декабря 2008 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан “\_\_\_” ноября 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Кандидат биологических наук

*Ващенко*

М.А. Ващенко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Аутоотомия является важной адаптацией, помогающей выживанию организмов. Процесс отбрасывания части тела животного в ответ на раздражающий фактор, например воздействие хищников, свойственен многим животным, как беспозвоночным, так и позвоночным. Аутоотомия наблюдается у представителей всех классов иглокожих (Emson, Wilkie, 1980; Wilkie, 2001) и возможна благодаря наличию специальной модификации соединительной ткани, которую принято называть «изменчивой коллагеновой тканью» (ИКТ) (mutable collagenous tissue, MCT) (Wilkie, 1979; Dobson, Turner, 1989; Heinzeller, Welsch, 1994; Wilkie et al., 1990, 1995, 1999; Byrne, 2001). ИКТ обнаружена только у представителей типа Echinodermata. Характерной особенностью ИКТ является способность к необратимому резкому снижению механической прочности связок (лигаментов) в специализированных для аутоотомии участках – плоскости аутоотомии, что облегчает отделение части тела животного под воздействием внешних факторов (Wilkie, 2001, 2002; Wilkie et al., 2004).

В наибольшей степени аутоотомия представлена у офиур, которые способны отбрасывать не только части лучей, но и диск с желудком, бурсами и гонадами (Turner, Murdoch, 1976; Wilkie, 1978a; Emson, Wilkie, 1980; Dobson, 1985; Dobson, Turner, 1989; Frolova, Dolmatov, 2008). Процесс аутоотомии аборальной части диска офиур – важная защитная функция, позволяющая выстраивать оборонительную стратегию таким образом, чтобы избежать длительного влияния раздражителей на тело животного. Известно, что офиуры обладают высокой скоростью восстановления поврежденных органов после аутоотомии. Например, аборальная часть диска вместе с внутренностями регенерирует за 7–10 сут (Литвинова, Жаркова, 1977; Фролова, Долматов, 2006).

К настоящему времени хорошо изучена регенерация желудочного эпителия после аутоотомии диска у офиуры *Amphipholis kochii* (Литвинова, Жаркова, 1977; Фролова, Долматов, 2006; Frolova, Dolmatov, 2008). В то же время комплекс структур, позволяющих офиуре отбрасывать аборальную часть диска (генитальных перекладин и лигаментов), до сих пор не исследован. Не ясны процессы и изменения, происходящие во время аутоотомии, ультраструктурные особенности организации места прикрепления диска к лучам.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы было выяснение особенностей строения структур, обеспечивающих аутономию аборальной части диска, и их формирование в онтогенезе и при регенерации. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие конкретные задачи:

- 1) изучить макро- и микроанатомию места прикрепления диска к лучу у офиур *Amphipholis kochii* и *Ophiura sarsi vadicola*;
- 2) изучить локализацию и тонкое строение юксталигаментных клеток и их скоплений в луче и диске офиуры *A. kochii* и *O. sarsi vadicola*;
- 3) исследовать процесс аутомии диска у *A. kochii*;
- 4) определить способ и источники регенерации и развития структур, участвующих в аутомии диска у офиуры *A. kochii*.

**Научная новизна.** Все основные научные результаты получены впервые. Выявлены особенности ультраструктурной организации юксталигаментной системы у двух видов офиур *A. kochii* и *O. sarsi vadicola*. Обнаружена связь между юксталигаментными узелками и нервными трактами гипонейрального отдела радиального нервного тяжа. Выявлены химические синапсы между отростками юксталигаментных и нервных клеток. Проанализировано строение ИКТ у офиур и значение этой ткани для иглокожих. Получены сравнительные данные по устройству места присоединения диска к лучу у этих животных, что позволило выдвинуть гипотезу о происхождении комплекса структур диска, участвующих в аутомии, в филогенезе Ophiuroidea.

Впервые изучены процессы аутомии на ультраструктурном уровне у офиур. Установлено участие гранул юксталигаментных клеток в процессах дестабилизации коллагеновых волокон. Полученные данные согласуются с гипотетической моделью аутомии иглокожих, предложенной Типпером с соавторами (Tipper et al., 2003).

Впервые показано, что офиура *O. sarsi vadicola*, несмотря на отсутствие способности к аутомии, может восстанавливать аборальную часть диска. Установлены сроки регенерации диска у этого вида. У офиуры *A. kochii* исследованы процессы регенерации и развития комплекса структур, участвующих в аутомии аборальной части диска (генитальных перекладин и их лигаментов). Определены источники регенерации и развития этих структур. Впервые обнаружено участие гранул юксталигаментных клеток в процессе структуризации коллагеновых волокон

во время формирования лигамента. Установлены сроки полного восстановления аборальной части диска у офиуры *A. kochii*.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Впервые проведен полный сравнительный морфо-функциональный анализ юксталигаментной системы и изучена макро- и микроанатомия места прикрепления диска к лучу у офиур. Исследованы процессы аутономии аборальной части диска офиур. Полученные результаты позволяют понять тонкие механизмы функционирования юксталигаментной системы и ее влияния на процессы аутономии, регенерации и развития некоторых структур этих животных. Наши данные расширяют представление о разнообразии ультраструктурной организации юксталигаментных клеток и их функциональных нагрузок у иглокожих. В свете полученных новых данных офиуры могут быть использованы в качестве удобной модели изучения гисто- и органогенеза. На основании описанных результатов можно глубже понять сущность феномена регенерации и развития не только у беспозвоночных, но и позвоночных животных, что, очевидно, поможет в решении вопроса об увеличении восстановительных потенций органов высших млекопитающих и человека.

**Апробация работы.** Материалы исследований докладывались на ежегодных научных конференциях ИБМ ДВО РАН (2005–2008 гг.). Основные положения диссертации доложены и обсуждены на международных конференциях VIII East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology (Казань, 2006) и 12<sup>th</sup> International Echinoderm Conference (Durham, USA, 2006), на международной научной школе для нейробиологов Pens/Hertie Winter School (Обергургль, Австрия, 2008).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 5 работ. Из них 2 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК РФ. 2 статьи приняты в печать.

**Структура и объем диссертации.** Работа построена в соответствии с традиционным планом и включает в себя введение, обзор литературы, краткую характеристику методов исследования, изложение собственных результатов авторов, выводы и список литературы (196 источников, из которых 31 на русском и 165 на иностранных языках). Диссертация изложена на 130 страницах и содержит 40 рисунков.

**Благодарности.** Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю, зав. лабораторией сравнительной цитологии ИБМ ДВО РАН, д.б.н. И.Ю. Долматову за приобретение навыков работы в области морфологии, регенерации и развития иглокожих. Искренне благодарю доктора Я.Ч. Вилки (Dr. I.C. Wilkie) (Калледонский Университет Глазго, Шотландия) за высокопрофессиональные консультации и ценные советы. Особую благодарность выражаю В.С. Машанову, Л.Т. Фроловой и М.Г. Елисейкиной (ИБМ ДВО РАН) за помощь в освоении методов электронной микроскопии и в работе с объектом. Я благодарю весь коллектив кафедры клеточной биологии АЭМББТ ДВГУ за полученные знания в области цитологии, а также коллектив лаборатории сравнительной цитологии ИБМ ДВО РАН за возможность проведения моей научной работы и за моральную поддержку. Я искренне признательна руководителю лаборатории электронной микроскопии ИБМ ДВО РАН Д.В. Фомину за возможность работы на оборудовании Центра коллективного пользования ИБМ ДВО РАН.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 02-04-49-481, № 05-04-48715, № 08-04-00284, а также гранта ДВО РАН грант № 06-III-A-06-159 (рук. И.Ю. Долматов).*

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на двух видах офиур, обитающих в Японском море, *Amphipholis kochii* Lütken, 1872 (Ophiuroidea, Amphiuridae) и *Ophiura sarsi vadicola* Djakonov (Ophiuroidea, Ophiolpidinae).

Взрослых особей офиуры *A. kochii* собирали в друзах *Crenomytilus grayanus* на глубинах 3-6 метров в зал. Восток Японского моря, а *O. sarsi vadicola* в районе о. Рикорда зал. Петра Великого Японского моря с песчаного грунта на глубине 25 метров. Аутономию диска вызывали физическим воздействием – диск животного поддевали пинцетом в области одного из радиусов и приподнимали над лучем. Регенерирующих офиур содержали в аквариуме с аэрируемой водой. Были проведены два независимых опыта по регенерации аборальной части диска офиур в августе и декабре 2007 г., когда температура воды в аквариуме составляла 18–20°C и 4–5°C, соответственно. Аутономия у офиур происходит при химическом и механическом воздействии (Литвинова, Жаркова, 1977). При фиксации в растворе глутарового альдегида у некоторых животных начиналась аутономия диска. У этих животных в

течение нескольких минут, пока фиксатор проникал в ткани, проходят самые первые стадии отделения диска, в результате у нас была возможность проследить начальные этапы аутономии. Другие офиуры, у которых инициация аутономии при фиксации не происходила, были использованы для изучения нормального строения места прикрепления диска к лучу.

Для изучения восстановительных потенций *O. sarsi vadicola* удаляли аборальную часть диска офиуры вместе с эпителием желудка двумя способами: 1) полностью отделяли аборальную часть диска от оральной; 2) вырезали часть диска, оставляя при этом радиальные щитки диска. Затем животных содержали в аквариуме с аэрацией. Исследование развития тканей и органов производили на офиурах с размером диска 0.5 мм и 1 мм (*A. kochii*) и 0.3 мм (*O. sarsi vadicola*).

Для морфологических исследований материал фиксировали в 4% растворе формалина. Декальцинацию проводили в течение 48 ч в нескольких сменах раствора, содержащего 1% аскорбиновой кислоты и 0.15 моль/л NaCl (Dietrich, Fontaine, 1975). Материал обезвоживали в этаноле возрастающих концентраций, в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали красителем трихроммиллиганом (Humason, 1979), который позволяет четко дифференцировать мышцы, нервы и соединительную ткань офиур (Wilkie et al., 1984), и гематоксилином по Эрлиху (Роскин, Левинсон, 1957) с докрасиванием эозином на общую морфологию.

Для приготовления полутонких и ультратонких срезов животных фиксировали в течение 24 ч в 2.5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.4), и затем дофиксировали 1ч 1% раствором OsO<sub>4</sub>. Декальцинацию проводили так же, как и в случае приготовления парафиновых срезов (Dietrich, Fontaine, 1975). Материал обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола, а затем – в ацетоне и заключали в смесь эпоксидных смол аралдита М и эпона 812 (Fluka). Срезы изготавливали на ультрамикротоме Ultracut E (Reichert) и Leica EM UC 6. Серийные полутонкие срезы окрашивали 1% раствором метиленового синего. Анализ и фотографирование полутонких срезов проводился с использованием светового микроскопа Jenamed 2 Carl Zeiss, оборудованного цифровой камерой Nikon D1X и светового микроскопа Leica DM 4500 B, оборудованного цифровой камерой Leica DFC 300 FX. Ультратонкие срезы контрастировали 1% раствором

уриилацетата на 10% этаноле и цитратом свинца по Рейнолдсу и просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе Jeol JEM-100S и Libra 120 Carl Zeiss.

Для сканирующей электронной микроскопии зафиксированный в растворе глутарового альдегида материал обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола и ацетоне, а затем высушивали в CO<sub>2</sub>. Высушенные образцы закрепляли на столиках, напыляли углеродом и анализировали с помощью сканирующего микроскопа LEO-430.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Особенности прикрепления диска к лучам у офиур *A. kochii* и *O. sarsi vadicola**

Выявлены различия в организации прикрепления диска к лучам у изученных видов офиур. Наиболее просто устроена система прикрепления у *O. sarsi vadicola*. Радиальные щитки диска через лигамент радиальных щитков (ЛРЩ) непосредственно присоединяются к латеральным щиткам луча (рис. 1). В результате этого формируется прочное соединение, предотвращающее отделение диска. Вероятно, вследствие этого данный вид не способен к аутотомии.

У *A. kochii* присоединение диска к лучам организовано иначе. Оно сходно с таковым, описанным для вида *Ophiophragmus filigraneus* (Dobson, Turner, 1989). Радиальные щитки диска связками ЛРЩ соединяются со специализированными скелетными образованиями – генитальными перекладинами, которые в свою очередь

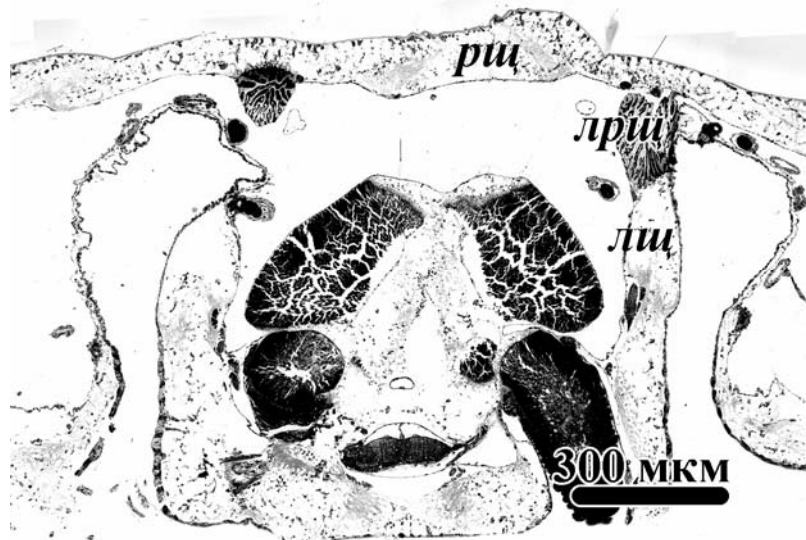


Рис. 1. Поперечный срез через место прикрепления диска к лучу у офиуры *O. sarsi vadicola*. лрщ – лигамент радиального щитка, лщ – латеральный щиток луча, рщ – радиальный щиток диска.



с помощью связок лигаментов генитальных переключин (ЛГП) прикрепляются к латеральным щиткам луча (рис. 2). Такая организация облегчает отделение диска и способствует аутомии. Следовательно, генитальные переключины и ЛГП представляют собой специализированный комплекс структур, обеспечивающих аутомию у офиур.

### ***Юксталигаментная система у офиур *A. kochii* и *O. sarsi vadicola****

Наше исследование показало, что все изученные лигаменты офиур *A. kochii* и *O. sarsi vadicola* имеют одинаковое гистологическое строение и состоят из ИКТ.

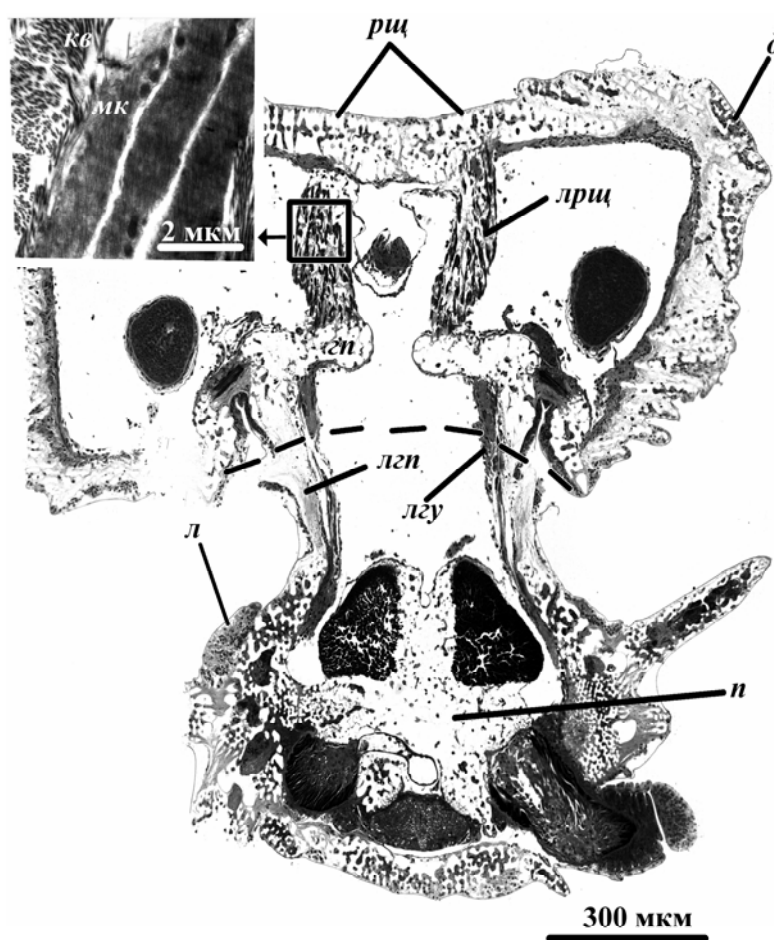


Рис. 2. Поперечный срез места прикрепления диска к лучу у офиуры *A. kochii*; врезка – увеличенный участок лигамента радиальных щитков.

*гп* – генитальные переключины, *д* – диск, *кв* – коллагеновые волокна, *л* – луч, *лгп* – лигамент генитальных переключин, *лгу* – юксталигаментный узелок лгп, *лрщ* – лигамент радиальных щитков, *мк* – мышечные клетки, *п* – позвонок луча, *рщ* – радиальные щитки диска, пунктирная линия – плоскость аутомии.

Постоянным компонентом ИКТ являются тонкие длинные отростки юксталигаментных клеток, содержащие характерные электроноплотные гранулы. Однако в ИКТ *O. sarsi vadicola* количество таких отростков значительно меньше, чем у *A. kochii*. Работы, проведенные рядом авторов в течение последних десятилетий, дают основание предполагать, что юксталигаментные клетки – это особая популяция клеток, которая играет ключевую роль в функционировании ИКТ иглокожих (Wilkie, 2001, 2002; Wilkie et al., 2004). Поскольку ИКТ встречается у всех иглокожих (Wilkie, 2002), но, по-видимому, отсутствует у других животных, эту ткань можно расценивать как некий критерий родства, т.е. синапоморфию типа Echinodermata (Wilkie, Emson, 1987; Gudo, Grasshof, 2002; Wilkie et al., 2004).

Мы установили, что юксталигаментная система лучей у офиур *A. kochii* и *O. sarsi vadicola* имеет сходный план строения, и представлена парными латеральными юксталигаментными узелками и тремя парами ганглиев иглопочек, расположенными снаружи мышечных образований. В то же время имеются и отличия. В частности, юксталигаментные узелки *O. sarsi vadicola* содержат меньшее число юксталигаментных клеток, в них преобладают тела и отростки нервных клеток. Отличительной особенностью этой системы у *A. kochii* является также наличие орального юксталигаментного узелка, который не обнаружен у офиуры *O. sarsi vadicola*. Кроме этого, отдельные юксталигаментные клетки и небольшие их скопления выявлены у *A. kochii* в радиальном нервном тяже и гипонейральных нервах.

Строение юксталигаментной системы луча у описанных нами офиур отличается от таковой *Ophiocomina nigra* (Wilkie, 1988). Так, в одном сегменте луча у этого животного обнаружено пять парных юксталигаментных узелков, которые располагаются с внутренней поверхности оральных и аборальных мышц. Тем не менее, несмотря на различия в организации юксталигаментной системы, все три вида офиур способны к аутоотомии лучей. Таким образом, по-видимому, способность к аутоотомии не связана строго с локализацией юксталигаментных узелков. Также можно предположить, что оральный узелок не имеет значения для аутоотомии лучей, поскольку, несмотря на его отсутствие *O. sarsi vadicola* легко отбрасывает лучи.

По-видимому, не все узелки юксталигаментной системы участвуют в аутоотомии диска. В частности интеррадиальные и радиальные юксталигаментные

узелки оральной рамки диска, которые расположены не в плоскости аутономии. Нами показано, что юксталигаментные узелки оральной рамки иннервируются латеральными ветвями гипонейрального отдела радиального нервного тяжа. По всей видимости, эти узелки обеспечивают работу одноименных лигаментов, направленных на изменение обратимых свойств ИКТ, в результате чего животное способно сохранять положение тела без участия мышечной системы (posture control). У некоторых представителей класса Ophiuroidea, способных к бесполому размножению путем деления на две части, как, например *Ophiocomella ophiactoides*, интеррадиальный лигамент, обслуживаемый юксталигаментным узелком, ответственен за деление животного в дорзо-вентральном направлении (Wilkie et. al., 1984). Возможно, узелки и лигаменты интеррадиуса диска офиур изначально служили вспомогательными структурами для деления животных, но с утратой бесполого размножения сменили свою функцию.

Важнейшую роль в процессе аутономии диска играет юксталигаментный узелок ЛГП (рис. 2), который по своему гистологическому строению является утолщением базисэпителиального нервного сплетения целомического эпителия. В работе Добсона и Тернера (Dobson, Turner, 1989) скопление клеток около ЛГП описывается как слой нейросекреторных клеток, сходных по своим морфологическим и гистохимическим характеристикам с юксталигаментными клетками. Данные исследователи разделяли эти типы клеток на основе их иннервации. Они считали, что нейросекреторные клетки иннервируются латеральными нервами эктонейрального отдела, в то время как юксталигаментные клетки – латеральными нервами гипонейрального отдела радиального нервного тяжа. Однако нами показано, что юксталигаментный узелок ЛГП связан через латеральный юксталигаментный узелок луча с гипонейральным отделом радиального нерва, где даже были обнаружены тела юксталигаментных клеток (Машанов и др., 2007). Таким образом узелок ЛГП образован настоящими юксталигаментными клетками.

Учитывая тонкое строение юксталигаментных клеток (Pentreath, Cottrell, 1971; Wilkie, 1979; Dobson, Turner, 1989; Byrne, 1994, 2001, Машанов и др., 2007), их гистохимические свойства и функции (Fontaine, 1962; Wilkie, 1979), можно рассматривать этот клеточный тип как нейросекреторные клетки. Именно этот юксталигаментный узелок участвует в аутономии аборальной части диска у *A. kochii*.

У офиуры *O. sarsi vadicola* отсутствуют скопления юксталигаментных клеток, соответствующие юксталигаментному узелку ЛГП *A. kochii* (рис. 1, 2). Очевидно, это связано с разным способом прикрепления диска у данных видов. По-видимому, юксталигаментный узелок ЛГП возник в филогенезе сем. Amphiuridae вместе с развитием лигамента и структур, облегчающих отделение аборальной части диска.

Происхождение юксталигаментной системы не совсем ясно. Поскольку эти клетки, находясь в ИКТ, не отграничены от внеклеточного матрикса базальной мембраной, было сделано предположение, что они в гистогенетическом отношении являются компонентом соединительной ткани и, следовательно, имеют мезодермальное происхождение (Cobb, 1987). С другой стороны, существует гипотеза, что юксталигаментные клетки представляют собой модифицированные нейроны (Wilkie, 1979, 1992). У морского ежа *Strongylocentrotus nudus* нейросекреторные клетки, сходные по строению с юксталигаментными клетками, обнаружены не только в соединительнотканном компартменте, но и в составе базэпителиального плексуса миоэпителия, что свидетельствует в пользу второй гипотезы (Dolmatov et al., 2007).

Нами показано, что аксоны нейронов тесно контактируют с отростками юксталигаментных клеток с формированием синапсов. На основании вышеизложенного можно предположить, что юксталигаментные клетки являются особой разновидностью клеток нервной системы, которые служат посредником между нейронами и ИКТ, обеспечивая эфферентную иннервацию последней.

Основной цитологической особенностью юксталигаментных клеток иглокожих является содержание в цитоплазме большого количества электроноплотных гранул и сильное развитие синтетического аппарата (Wilkie, 2001; Dolmatov et al., 2007; данная работа). Различия между клетками в количестве гранул и цистерн ШЭР можно, вероятно, отнести за счет того, что в каждый данный момент времени разные клетки могут проходить различные стадии секреторного цикла. Природа содержимого гранул не до конца выяснена. Гистохимические реакции указывают на высокое содержание гликопротеинов и ионов  $Ca^{2+}$  (Wilkie, 1979). В гранулах юксталигаментных клеток голотурии *Cucumaria frondosa* был идентифицирован ряд белков (тензилин, стипарин, пептид-“пластификатор”) (D. R. Keene, J. A. Trotter, неопубл. данные; цит. по: Wilkie et al., 2004), которые, как было показано в

экспериментах *in vitro* на изолированных препаратах дермы, способны изменять механические свойства соединительной ткани *C. frondosa*, причем эффект этот зависит от внеклеточной концентрации ионов кальция (Koob et al., 1999).

Стоит обратить внимание на тот факт, что размер гранул, содержащихся в юксталигаментных клетках различен. Обнаружены округлые гранулы (100-150 нм в диаметре) и продолговатые гранулы (достигающие 250-300 нм в ширину и 500-550 нм в длину). Некоторые авторы предполагают, что существует два типа юксталигаментных клеток, различающихся размером гранул и играющих разную роль в процессах дестабилизации и стабилизации соединительной ткани (Wilkie, 1979; Tipper et al., 2003). Согласно гипотезе Типпера (Tipper et al., 2003), одни гранулы, содержащие тенсилиновые протеазы, выделяются в соединительную ткань при аутомии, в результате чего разрушаются прочные тенсилиновые связи между коллагеновыми волокнами. Другие содержат тенсилин, который при необходимости восстанавливает связи между волокнами. Эти процессы регулируются нервной системой, тесно взаимодействующей с юксталигаментной системой. Однако наши данные не подтверждают эту точку зрения. У *A. kochii* и *O. sarsi vadicola* были обнаружены клетки, содержащие гранулы разного размера.

Выраженность юксталигаментной системы коррелирует со способностью отделов тела к аутомии. У всех изученных видов офиур юксталигаментная система хорошо развита в лучах, которые могут легко отбрасываться. В то же время у *O. sarsi vadicola* она не развита в диске, возможно, имеются единичные юксталигаментные клетки в составе гипонейральных нервов, иннервирующих диск. У *A. kochii* юксталигаментная система диска представлена также широко, как и в луче (узелки оральной рамки), а кроме этого хорошо развит юксталигаментный узелок ЛПП, который по своей локализации занимает промежуточное место между лучом и диском, и участвует в аутомии аборальной части диска.

#### ***Формирование места прикрепления диска к лучу в онтогенезе офиур A. kochii и O. sarsi vadicola***

Ранние стадии формирования места прикрепления диска к лучу у *A. kochii* и *O. sarsi vadicola* одинаковы. Сначала происходит образование латеральных щитков луча и радиальных щитков диска и связок между ними. Строение места «диск-луч» у

данных видов в это время выглядит сходным образом. Радиальные щитки диска прикрепляются к латеральным щиткам луча с помощью ЛРЩ. Затем, у *O. sarsi vadicola* происходит лишь рост этих структур, утолщаются щитки, увеличиваются связки, после чего происходит полное обызвествление щитков.

У *A. kochii* дальнейшее развитие протекает иначе. После образования радиальных щитков и ЛРЩ латеральный щиток обызвествляется не полностью. Формирование кристаллов кальцита происходит в оральной половине и на самом аборальном конце. Средняя часть не кальцифицируется и преобразуется в ЛГП. В это же время происходит формирование юксталигаментного узелка ЛГП. Аборальные части латерального щитка разрастаются за счет увеличения количества межклеточного вещества, а затем обызвествляются, преобразуясь в генитальные перекладины.

При развитии структур аутономии нами было обнаружено взаимодействие юксталигаментных гранул с волокнами коллагена. Возможно, таким образом происходит упорядочивание коллагена и структуризация соединительной ткани. Развитие юксталигаментной системы в разных частях тела офиур происходит неравномерно. У особей *A. kochii* с диаметром диска 0.5 мм и *O. sarsi vadicola* с диаметром диска 0.3 мм, юксталигаментные узелки лучей уже сформированы, хотя еще сохраняются признаки не характерные зрелым клеткам (например, желточные гранулы). Юксталигаментный узелок ЛГП у *A. kochii* формируется позднее. У особей с диаметром диска 0.5 мм юксталигаментные клетки образуют небольшое скопление и граничат с соединительной тканью. Отростки этих клеток неглубоко проникают в лигамент. Позднее, происходит увеличение числа юксталигаментных и нервных клеток, их компактизация и переплетение их отростков с образованием узелка.

Возможно, данные особенности развития узелков связаны с их функциональным назначением. Поскольку юксталигаментные узелки луча, предположительно, контролируют аутономию луча, что является общим свойством для всех офиур (Emson, Wilkie, 1980), формирование этих структур происходит на ранних стадиях эмбриогенеза. Аутономия диска – явление характерное в основном для представителей сем. Amphiuridae. Вероятно, более позднее развитие юксталигаментного узелка ЛГП, участвующего в отбрасывании аборальной части диска, является косвенным доказательством того, что аутономия в филогенезе этого

семейства сформировалась позднее. Она представляет собой пример адаптивной надстройки морфогенеза у этих животных. Такая конструкция помогает офиурам противостоять натиску хищников и сохранять численность популяции.

Исходя из данных по морфологии и развитию места прикрепления диска, можно предположить, что исходным был тип прикрепления, представленный у офиуры *O. sarsi vadicola*. У этого вида радиальные щитки диска с помощью связок напрямую присоединяются к латеральным щиткам луча. По-видимому, образование структур диска, способствующих его отделению, выглядело следующим образом. Постепенно происходила деминерализация соединительной ткани средних участков латеральных щитков луча (рис. 3), вследствие чего щитки разделились на собственно латеральный щиток, лигамент ЛГП и аборальную часть. Последняя дала начало генитальной перекладине. В результате латеральный щиток приобрел способность разделяться на оральную и аборальную части.

Структуры, облегчающие отделение диска в сем. Amphiuridae, вероятно, сформировались в ответ на возросший прессинг хищников. В мезозое, по предположению некоторых палеонтологов, произошла “морская революция” (Vermeij, 1977). Появление новых видов хищных ракообразных и костных рыб

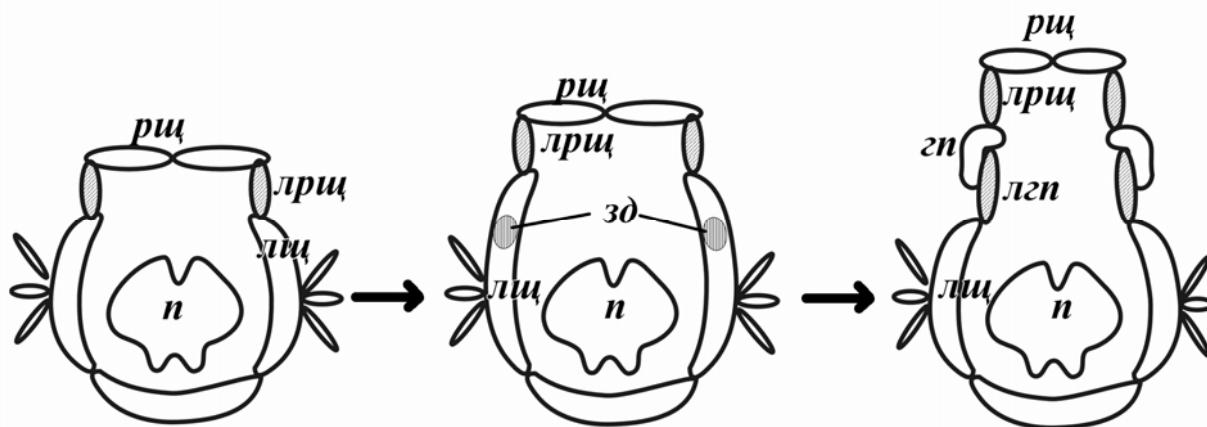


Рис. 3. Схема образования генитальных перекладин и связок ЛГП в филогенезе сем Amphiuridae.

гп – генитальные перекладины, зд – зоны деминерализации латерального щитка, лгп – лигамент генитальной перекладины, лриц – лигамент радиального щитка диска, лщ – латеральный щиток луча, n – позвонок луча, риц – радиальные щитки диска.

вызвало драматические изменения в распределении и жизненных циклах многих представителей мелководных экосистем беспозвоночных. В частности, стебельчатые лилии были вытеснены с мелководья и в настоящее время обитают только в батинальной зоне (Oji, 1996). Сходные изменения отмечаются и у офиур (Aronson, 1987, 1989). Однако офиуры успешнее противостояли воздействию хищников, сохранив до настоящих дней в некоторых мелководных местах обитания большую численность. Одной из причин этого, очевидно, является высокая скорость восстановления поврежденных органов (Долматов, 1999). Нами было показано, что вне зависимости от наличия аутомии офиуры способны к быстрому восстановлению значительных повреждений диска. Офиура *O. sarsi vadicola* обитает на большой глубине, где воздействие хищников меньше. К тому же у этого вида выработалась поведенческая адаптация – животные способны зарываться в грунт.

У *A. kochii* и других представителей сем. Amphiuridae выработались другие приспособления. В филогенезе этой группы появилась способность к аутомии. Эта адаптация позволяет офиурам при непосредственном контакте с хищником уходить от опасности, отбрасывая аборальную часть диска. Кроме того, животное без диска имеет меньшую толщину и может спрятаться в более узкую щель, что дает ему возможность лучше спрятаться.

#### ***Аутомия диска у офиур A. kochii и O. sarsi vadicola***

Офиура *O. sarsi vadicola* не способна аутомировать диск. При искусственном отделении аборальной части разрушается связь диска с оральной рамкой и лучами. Животное несколько дней сохраняет жизнеспособность, но в дальнейшем тело его разрывается в районе оральной рамки и распадается на отдельные лучи с фрагментами околоротовых структур. Части офиуры после этого быстро погибают.

Аутомия диска у *A. kochii* происходит достаточно легко. Она осуществляется по такому же принципу, как и аутомия луча. Интересно отметить, что даже время аутомии луча приблизительно равно времени отделения генитальных перекладин. Так, скорость аутомии луча исследовали на группе офиур (сорок особей). Время отделения луча варьирует от 0.4 до 5.4 сек (Wilkie, 1978b), в свою очередь аутомия генитальных перекладин занимает от 0.7 сек до 3.1 сек. По мнению Уилки (Wilkie, 1978b) такая быстрая реакция на раздражение свидетельствует о вовлечении нервной



системы в процесс аутономии. Dobson (1985) обнаружил, что отделение диска обратимо блокируется анестетиками и необратимо – холинергическими антагонистами, а также ускоряется в присутствии некоторых нейротрансмиттеров. Эти данные являются доказательством нервной медиации процесса аутономии.

Ранее было установлено, что аутономия иглокожих происходит не только в результате мышечных сокращений, но и за счет резкой потери прочности связок (изменений свойств ИКТ), и высказывались предположения о том, что изменения свойств соединительной ткани происходит под контролем нервной системы (Takahashi, 1967b; Smith, Greenberg, 1973; Wilkie, 1976, 1978b). Позднее появилась гипотеза об участии юксталигаментных клеток в аутономии. Предполагалось, что вещества юксталигаментных гранул разрушают связи между волокнами коллагена, который теряет свою упорядоченную организацию, вследствие чего падает механическая прочность лигамента, что и приводит к повреждению целостности ткани (Wilkie, 2005).

Наше исследование подтверждает непосредственное участие содержимого гранул юксталигаментных клеток в дестабилизационных процессах соединительной ткани. В процессе аутономии происходят изменения юксталигаментных отростков в ЛГП. Сначала разрушается их плазмалемма и мембрана гранул. Количество гранул в цитоплазме отростков резко уменьшается, по-видимому, за счет выделения содержимого гранул в окружающий соединительно-тканый матрикс, где, вероятно, происходит их быстрое растворение. Одновременно с этим нарушается целостность покровов. Фрагментируется кутикула, апикальные отростки эпидермальных клеток вытягиваются и отслаиваются от кутикулярной пластинки. Кроме того, происходит дезорганизация коллагена, нарушаются межфибриллярные связи, пучки коллагена распадаются на отдельные фибриллы, что приводит к потере прочности лигамента в целом. Результатом всех этих процессов является разрыв мягких тканей и отделение аборальной части диска.

Обобщая имеющийся фактический материал и собственные данные можно предположить следующий механизм аутономии аборальной части диска у офиур сем. *Amphiuridae*. После сигнала об опасности, нервная система передает возбуждение юксталигаментным клеткам, в результате чего происходит выброс гранул во внеклеточный матрикс и их растворение. Следствием этого является процесс

дезорганизации коллагеновых волокон, ЛГП теряет свою прочность. Одновременно с этим, нервный импульс идет к мышцам ЛРЩ. Мышечные волокна сокращаются и подтягивают генитальные перекладины к радиальным щиткам. Уменьшение прочности ЛГП приводит к тому, что лигамент под действием мышечного сокращения разрывается.

Аутономия как способность отбрасывать конечности и другие придатки появилась в эволюции животных в ответ на повреждающее действие внешней среды и является защитной реакцией организма от хищников (Bliss, 1960; Needham, 1965). Поскольку основной функцией такого типа аутономии является избегание хищников, это предопределило высокую скорость процесса отбрасывания придатков.

У многих животных даже выработались специальные структуры, облегчающие деление и сводящие повреждение к минимуму. У иглокожих в аутономии всегда задействованы специализированные зоны повреждения с определенными морфологическими признаками, т.е. потенциальные зоны «слабых мест», которые облегчают отделение (Wilkie, 2001). В результате аутономии образуется рана с предсказуемой топологией и минимальным повреждением, что способствует ускорению ее заживления. Очевидно, отделение диска в интеррадиусах происходит именно в такой специализированной зоне – плоскости аутономии, а ЛГП можно обозначить, как часть анатомической адаптации для аутономии диска офиур в области радиусов.

Все эти приспособления для аутономии возникли в эволюции животных независимо и не гомологичны друг другу. Формирование генитальных перекладин и ЛГП свойственны представителям сем. Amphiuridae и у других офиур не встречается. По-видимому, эти приспособления возникли не случайно, а как адаптация, позволяющая животным выжить в неблагоприятных условиях.

Таким образом, проведенное исследование показало, что аутономия диска офиуры *A. kochii* происходит под воздействием внешних факторов не случайным образом, а в определенной зоне, плоскости аутономии. Этот процесс находится под контролем нервной системы и тесно связан с работой специализированной популяции клеток нервной системы - юксталигаментных клеток.

### ***Регенерация аборальной части диска у офиур***

Несмотря на отсутствие аутомии аборальной части диска, *O. sarsi vadicola* может регенерировать диск в том случае, если радиальные щитки остаются неповрежденными. Так полное восстановление диска после операции происходит уже на 16 сут. Литвинова и Жаркова предполагали, что *O. sarsi vadicola* гибнет при утрате лучей (Литвинова, Жаркова, 1977). В пользу этого говорит тот факт, что регенерация лучей занимает длительное время, а среди пойманных в море особей этого вида очень редко встречаются животные с обломанными лучами. Возможно, в естественных условиях такое животное становится легко уязвимым для хищника, поэтому регенерирующие особи этого вида практически не встречаются. Однако в наших исследованиях почти все животные аутомировались от 1 до 3 лучей, и, тем не менее, продолжали жить в аквариуме.

Как и у *A. kochii* (Фролова, Долматов, 2006) регенерация диска *O. sarsi vadicola* происходит за счет клеток эпителия желудка и покровов диска. Вероятно, именно на способности древних офиур восстанавливать утраченные ткани в довольно быстрые сроки и основывалось развитие такого феномена, как аутомия диска у *A. kochii*. Таким образом, появление таких специализированных структур, как генитальные перекладки и ЛГП является адаптивной надстройкой морфогенеза офиуры *A. kochii*. А развитие юксталигаментного узелка ЛГП произошло в результате увеличения нагрузки на юксталигаментную систему луча.

### ***Регенерация комплекса структур, участвующих в аутомии аборальной части диска офиуры A. kochii***

При регенерации офиуры используют общую для всех иглокожих стратегию – скорейшее восстановление наиболее важных для выживания структур (Долматов, 1993; Долматов, Машанов, 2007). Прежде всего развивается пищеварительная система, поскольку от нее зависит возможность особи питаться (Фролова, Долматов, 2006; Mozzi et al., 2006; Долматов, Машанов, 2007). Способность к аутомии не столь важна для выживания, и, вероятно, поэтому структуры, участвующие в отделении аборальной части диска, формируются позднее, на 25-е сут.

Скорость восстановления диска у офиуры *A. kochii* зависит от таких факторов, как температура и соленость воды, различные стадии полового цикла. Так, период

регенерации диска увеличивается в два раза при понижении воды до 4С°. Кроме того, аутоотомия аборальной части диска значительно затруднена во время созревания гонад животного. Это общая тенденция для иглокожих. Например, у морских звезд, не обладающих бесполом размножением, резкое снижение восстановительных возможностей приходится на тот период жизненного цикла, который предшествует нересту и нерестовому периоду (Синюшкина, 1975). Атрофия кишечника и эвисцерация у голотурий чаще всего происходят после завершения полового цикла (Emson, Wilkie, 1980; Лейбсон, 1982). Некоторые авторы считают, что поскольку и аутоотомия и восстановительный морфогенез находятся под контролем нейрогормональных факторов, то причины возрастных и сезонных изменений этих процессов следует искать в изменении нейрогормонального фона животных в различные периоды жизненного цикла (Короткова, 1997).

У офиуры *A. kochii* на начальных этапах формирования генитальных переключин образование кристаллов кальцита происходит внутриклеточно в специальных клетках склероцитах. Позднее, кристаллы кальцита выделяются во внеклеточный матрикс и кальцификация продолжается уже внеклеточно. Интересно отметить, что склероциты выстраиваются в цепочку и образуют септированные контакты между собой, формируя структуру, напоминающую эпителий. Ранее подобные свойства склероцитов замечены не были.

Мы также отметили влияние юксталигаментных клеток на формирование соединительной ткани лигаментов. Как и в онтогенезе офиуры, гранулы юксталигаментных отростков, обнаруженных в местах скопления коллагеновых волокон, отделяются с небольшим участком цитоплазмы от клетки и попадают в соединительно-тканый матрикс. Между этими гранулами и волокнами коллагена обнаружены связи.

Офиуры – прекрасная модель для экспериментов, касающихся клеточных основ репарации. Литературные источники свидетельствуют о том, что регенерация у офиур протекает благодаря комбинации процессов эпиморфоза и морфаллаксиса (Долматов, 1999; Candia Carnevali, 2006). Нами установлено, что регенерация генитальных переключин и ЛГП происходит за счет надстройки над поврежденной частью (латеральным щитком), а также миграции клеток из тканей оставшихся после аутоотомии. Пролиферации клеток в местах морфогенеза мы не обнаружили.

Следовательно, регенерация структур диска (генитальных переключателей и ЛГП) происходит в результате комбинации механизмов эпиморфоза и морфаллаксиса.

В исследованиях, проведенных ранее (Литвинова, Жаркова, 1977; Фролова, Долматов, 2006), указывалось, что период полной регенерации диска составляет около 21 сут. Однако в этих работах не изучена способность вновь восстановленного диска к аутономии. Согласно нашим данным, структуры аутономии регенерируют только на 25-е сут. По нашему мнению, именно этот срок следует считать окончанием регенерации. У офиуры *Micropholis gracillima* диск приобретает пятигранную форму, и животное возобновляет способность к аутономии уже на 16-е сут с момента повреждения (Dobson, 1988). При этом диаметр диска составляет только 2.5 мм. Таким образом, процессы регенерации диска и структур аутономии не строго коррелированы и зависят от видовой принадлежности животного. Все это может быть обусловлено генетическими причинами, однако для лучшего понимания влияния различных факторов на процесс регенерации диска необходимы дальнейшие сравнительные исследования регенерации на представителях различных семейств класса Ophiuroidea.

### Заключение

Наше исследование показало, что у офиур имеются различные способы прикрепления диска и лучей, что обуславливает наличие или отсутствие способности к аутономии. У *Ophiura sarsi vadicola* радиальные щитки диска за счет лигамента напрямую присоединяются к латеральным щиткам луча. В результате этого формируется прочное соединение, предотвращающее отделение диска. При искусственном удалении диска разрушается оральная рамка, животное распадается на отдельные лучи и погибает. У *Amphipholis kochii* прикрепление диска к лучам более лабильно. Между радиальными щитками диска и латеральными щитками луча имеются промежуточные структуры, генитальные переключатели. Все эти скелетные образования соединяются специальными связками. При этом лигамент генитальных переключателей представлен «изменчивой коллагеновой тканью», механическая прочность которой находится под контролем скопления специализированных клеток – юксталигаментного узелка. Такая организация облегчает отделение диска и способствует аутономии. Следовательно, генитальные переключатели, лигаменты и

юксталигаментный узелок генитальных перекладин представляют собой специализированный комплекс структур, обеспечивающих аутономию у офиур.

Юксталигаментная система лучей у офиур *A. kochii* и *O. sarsi vadicola* имеет сходный план строения, и представлена парными латеральными юксталигаментными узелками и тремя парами ганглиев иглобочек. Явной отличительной особенностью этой системы у *A. kochii* является наличие орального юксталигаментного узелка, который не обнаружен у офиуры *O. sarsi vadicola*. По-видимому, способность к аутомии не связана строго с локализацией юксталигаментных узелков. Также можно предположить, что оральный узелок не имеет значения для аутомии, поскольку, несмотря на его отсутствие *O. sarsi vadicola* легко отбрасывает лучи.

Важнейшую роль в процессе аутомии играет юксталигаментный узелок лигамента генитальных перекладин. У офиуры *O. sarsi vadicola* отсутствуют скопления юксталигаментных клеток, соответствующие этому узелку. По-видимому, юксталигаментный узелок лигамента генитальных перекладин возник в филогенезе сем. Amphiuroidae вместе с развитием самого лигамента и структур, облегчающих отделение аборальной части диска.

Основной особенностью юксталигаментных клеток иглокожих является наличие в цитоплазме большого количества электроноплотных гранул и хорошее развитие синтетического аппарата. Различия между клетками в количестве гранул и цистерн ШЭР можно, вероятно, объяснить тем, что в каждый данный момент времени разные клетки могут проходить различные стадии секреторного цикла.

Нами было показано, что ранние стадии формирования места прикрепления диска к лучу у изученных видов офиур сходны и состоят в образовании латеральных щитков луча, радиальных щитков диска и связок между ними. Вероятно эту систему можно считать исходной, предковой формой. У *O. sarsi vadicola* строение в дальнейшем не меняется. У *A. kochii* латеральный щиток обызвествляется не полностью, формирование кристаллов кальцита в центральной части не происходит. В результате она преобразуется в лигамент, а аборальная обызвествленная часть – в генитальные перекладки.

Такое преобразование места соединения диска с лучами приводит к тому, что появляется возможность отделения диска у *A. kochii* с минимальными повреждениями. В процессе аутомии большую роль играет система

юксталигаментных клеток, которая изменяет прочность соединительной ткани лигамента, способствуя его разрыву. После отделения аборальной части диска регенерация генитальных перекладин и их лигаментов происходит за счет надстройки над поврежденной частью (латеральным щитком), а также миграции клеток из тканей оставшихся после аутономии. Пролиферации клеток в местах морфогенеза мы не обнаружили. Следовательно, регенерация структур диска (генитальных перекладин и ЛГП) происходит в результате комбинации механизмов эпиморфоза и морфаллаксиса.

## ВЫВОДЫ

1. У офиуры *Amphipholis kochii* в месте прикрепления диска к лучу имеется специализированный комплекс структур, который обеспечивает аутономию аборальной части диска. Он представлен генитальными перекладинами, лигаменгами генитальных перекладин и юксталигаментными узелками лигаментов генитальных перекладин.
2. Офиура *Ophiura sarsi vadicola* не может отбрасывать диск, и у нее отсутствует специализированный комплекс структур (генитальные перекладины, лигаменты и юксталигаментные узелки). Несмотря на это, данный вид обладает хорошей способностью к регенерации аборальной части диска.
3. Юксталигаментная система офиур *Amphipholis kochii* и *Ophiura sarsi vadicola* имеет сходный план строения, однако у офиуры *Ophiura sarsi vadicola* отсутствует юксталигаментный узелок лигамента генитальной перекладины. Юксталигаментные узелки образованы юксталигаментными клетками, основной характеристикой которых является наличие большого количества электроноплотных округлых или продолговатых окруженных мембраной гранул и сильное развитие синтетического аппарата.
4. Процесс аутономии аборальной части диска офиур включает следующие стадии:
  - 1) возбуждение юксталигаментных клеток и выброс гранул во внеклеточный матрикс;
  - 2) дестабилизация лигамента;
  - 3) сокращение мышечных волокон лигамента радиального щитка диска;
  - 4) разрыв лигамента генитальных перекладин под действием мышечного сокращения;
  - 5) отделение диска от оральной рамки.
5. Генитальные перекладины и их лигаменты в онтогенезе и при регенерации у офиуры *Amphipholis kochii* формируются сходным образом. Клеточными источниками образования этих структур являются склероциты и фибробласты соответственно. Восстановление генитальных перекладин и лигаментов происходит в результате комбинации механизмов эпиморфоза и морфаллаксиса.
6. Специализированный комплекс структур, обеспечивающий аутономию диска у *Amphipholis kochii*, возник в результате преобразования латеральных щитков лучей и развития мышечной системы лигамента радиальных щитков диска.



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Charlina N.A., Mashanov V.S., Dolmatov I.Yu., Wilkie I.C. Juxtaligamental cells in the ophiuroid *Amphipholis kochii* // Abstracts of the VIII East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology. Kazan. 2006. P. 12.
2. Charlina N.A., Mashanov V.S., Dolmatov I.Yu., Wilkie I.C. Morphology of the juxtaligamental system in the ophiuroid *Amphipholis kochii* // Abstracts of the 12<sup>th</sup> International Echinoderm Conference. Durham NH: University of New Hampshire. 2006. P. 75.
3. Машанов В.С., Чарлина Н.А., Долматов И.Ю., Уилки Я.Ч. Юксталигаментные клетки в луче офиуры *Amphipholis kochii* Lütken, 1872 (Echinodermata: Ophiurae) // Биология моря. 2007. Т. 33, № 2, С. 136-143.
4. Charlina N.A., Dolmatov I.Yu., Wilkie I.C. Changes of MCT properties by neural control on *Amphipholis kochii* example // Abstracts of the PENS/Hertie Winter School 2008 / The Design of Neural Networks: Contributions from Invertebrates. Obergurgl: Universitätszentrum Obergurgl. 2008. P. 68.
5. Чарлина Н.А., Долматов И.Ю. Регенерация комплекса структур, участвующих в аутономии аборальной части диска у офиуры *Amphipholis kochii* Lütken, 1872 (Ophiuroidea: Ophiurae) // Биология моря. 2008. Т. 34, № 6, С. 414-418.
6. Charlina N.A., Mashanov V.S., Dolmatov I.Yu., Wilkie I.C. Morphology of the juxtaligamental system in the ophiuroid *Amphipholis kochii* // Echinoderms. Durham NH: University of New Hampshire. (in press).
7. Charlina N.A., Dolmatov I.Yu., Wilkie I.C. The juxtaligamental system of the disc and oral frame of the ophiuroid *Amphipholis kochii* Lütken, 1872 (Echinodermata: Ophiuroidea) and its role in autotomy // Invertebrate Biology. (in press).

ЧАРЛИНА  
Наталья Александровна

СТРОЕНИЕ, РАЗВИТИЕ И РЕГЕНЕРАЦИЯ КОМПЛЕКСА СТРУКТУР,  
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ АУТОТОМИЮ ДИСКА У ОФИУР

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук